

Relaxin の実験的不活性化及び Relaxin の *in vitro*

子宮攣縮抑制に対する Oxytocic な物質の阻害

和田 宏・湯原正高

Experimental Inactivation of relaxin and Disturbances by Oxytocic Substances
towards Inhibition of Relaxin upon Uterine Contractions *in vitro*.

Hiroshi WADA, Masataka YUHARA

Influences of heating, digestion with proteolytic enzyme and aeration with oxygen upon two main physiological activities of relaxin — relaxation of symphysis pubis and inhibition of uterine motility *in vitro* — were studied in these experiments. Besides, effects of oxytocin, trypsin preparation, muscle extract and intestinal extract upon the uterine motility were studied; we found that they disturb the effect of relaxin uterine motility by their oxytocic influences.

(1) Relaxitive effect of relaxin preparation upon the symphysis pubis was lost by digestion with trypsin or pepsin at 37°C. for two hours.

(2) Relaxitive effect of relaxin preparation upon the symphysis pubis was scarcely diminished by heating at 63°C. for 30 minutes, but it was lost by heating at 63°C. for one hour. However, inhibitory effect of relaxin preparation upon spontaneous uterine motility *in vitro* was not lost by heating at 63°C. for one hour, but it was lost completely by heating at 100°C. for one hour. Accordingly, it seemed that temperatures which destroy these two physiological effects above mentioned of the relaxin preparation differ from each other.

(3) Exposure to aeration with oxygen (60cc./min. for 4 hours) did not diminish relaxin activity.

(4) From these results, relaxin is relatively labile to heating; and in view of digestibility with proteolytic enzym, it seems likely that relaxin is a polypeptide as other investigators have already reported.

(5) The trypsin preparation used showed a remarkable oxytocic effect upon the uterus as oxytocin. After heating at 63°C. for one hour or at 100°C. for 30 minutes, trypsin preparation showed a little oxytocic effect; but its oxytocic protency was destroyed completely by heating at 100°C. for one hour.

(6) Pepsin preparation did not show any influence upon the uterine motility in neutral solution which was, however, not a suitable condition for enzymatic activity of pepsin.

(7) The muscle and the washed intestine (ileum) of the rat were immersed in Locke's solution at 0°C. or 37°C. for 4 hours. Both the extract of muscle and that of intestine showed oxytocic effect, and the effect of the latter was somewhat more

effective than that of the former. Accordingly, there seems to be various relaxin inhibitor concerning uterine motility *in vitro*.

(8) Oxytocin itself, owing to its nature, inhibited the effect of relaxin, but a very exhausted uterus responded neither to oxytocin nor to relaxin.

筆者等はこれまでに反芻家畜に於ける Relaxin の存在及び *in vitro* の子宮の運動に対する Relaxin の抑制効果を報告した。Relaxin の一般的性質を知る為に加熱、蛋白分解酵素による消化などにより Relaxin の実験的破壊を企みた。また、これと関連して、Oxytocin は当然明らかに *in vitro* で子宮運動に対する Relaxin の効果を抑制したが、此の他に Trypsin 製品や腸管及び筋肉浸出液が Oxytocic な作用を呈して Relaxin の効果を阻害することを知つたので、これらの知見もあわせて報告する。

I 実験材料及び方法

〔I〕 Relaxin の実験的不活性化

力価既知の Relaxin preparation に対し加熱、酸素ガスの通気及び蛋白分解酵素による消化などの処理を行い、その試料の Relaxin 力価を検定し不活性化の程度を検べた。Relaxin の検定は筆者等がこれまで述べた如く Abramowitz et al. (1944) の方法を僅に修飾した方法によつた。従つて此の場合、恥骨反応に対する効力の低減の検定を意味するものである。

本実験に於て用いた Relaxin 製品は Dr. Frieden, E. H. の厚意により寄贈を受けたもので前報に於て用いたものと同一のものでその製品記号は P-123-1, その力価は 20~40GPU/mg の lyophilized preparation であつた。筆者等は此の Relaxin 製品を検定しその力価を 20GPU と認めて使用した。Relaxin 製品は一樣に 4GPU/cc の濃度に溶解したものを原液とし、これをそのまま、または夫々の処理を施してモルモット 1 頭に対し 2GPU 即ち 0.5cc づつ 1 回注射した。2GPU の Relaxin では供試動物の殆ど総べてのものが反応して恥骨弛緩を生ずる筈であり、非反応動物数により Relaxin 不活性化の程度を知り易いためである。これらの Relaxin 含有試料に対し 63°C または 65°C で 30 分及び 1 時間、また 100°C で 1 時間加熱を行つた。

蛋白分解酵素として持田製薬株式会社製の Trypsin (lyophilized crystalline Trypsin) 及び Grubler 製の Pepsin を用いた。20~25 GPU の Relaxin 含有容液に対し 10,000 H. U. M. (Haemoglobin Unit of Mochida) 及び 20,000 H. U. M. の Trypsin を加え 37°C で 2 時間、加温し消化を行つた。此の場合、緩衝液としては pH 7.1 の Sørensen の磷酸緩衝液 (Na_2HPO_4 6.6mg/cc + KH_2PO_4 2.7mg/cc) を用い之に Relaxin と Trypsin を加え 37°C で接触させた。従つて此の対照試験として Relaxin のみを緩衝液に溶解し 37°C、2 時間の加温も行つた。

Pepsin は Sørensen の pH 1.8 の枸橼酸-塩酸緩衝液に溶解し、これに 20~25GPU の Relaxin を混じ 37°C で 2 時間消化し、之を少量の NaOH 液で中和してから供試した。

酸素ガスによる通気はガラス細管の先端を、30GPU を溶解した 15cc の Relaxin 溶液の容器の底に入れて、ほぼ 60cc/min 程度の速度で O_2 を出して 1 時間及び 4 時間、酸化を行つた。

以上の如き不活性化 Relaxin 試料を検定用モルモットに注射し、その骨盤弛緩に対する力価を検定し、種々の処理による不活性化の程度を検べた。さらに、次の〔II〕の実験と同様な方法で Magnus 装置 (栄養液 40cc を使用) のもとに、熱不活性化 Relaxin の子宮運動に対する効果の有無を観察した。

〔II〕 Relaxin の子宮攣縮抑制効果に対する Oxytocic な物質の阻害。

卵巣剔除後少くとも12日以後の成熟ラッテに Estradiol monobenzoate を37 づつ3日間注射し、4日目に剔除し直ちに冷栄養液中に保つた子宮を此の実験に用いた。栄養液としては Locke's solution を用い、その量を40ccとし、Magnus装置のもとで前述の子宮標品の *in vitro* の等張的運動(張力1.5g)を行わせ、それを Kymograph の煤煙紙上に記録した。〔I〕の実験に於て Trypsin で不活性化した Relaxin 溶液が完全消化されたか否かを検べるために被検試料の子宮運動に対する影響を検討中に Trypsin 製品が Oxytocic な作用を呈することを知らることが出来た。此の関係をさらに検討する為に蛋白分解酵素として Trypsin のみならず Pepsin を用いた。また Oxytocin を用いて、それらの関係を比較研究した。供試した Oxytocin は帝國臓器株式会社の Atonin-O で、その0.5cc中に5 I.U. の Oxytocin を含むものであり、これを少量の栄養液で稀釈して用いた。また Trypsin は〔I〕に前述した持田製薬株式会社の結晶 Trypsin であり、Pepsin も同じく前述の Grubler の製品であり、これらを夫々少量の栄養液に溶解して37°Cで Relaxin と接触させた。また、これらの蛋白分解酵素の熱不活性化したもの或いは何等の処理を受けず活性のあるものを運動しつつある子宮標品を入れた容器に注加した。但し Relaxin の Pepsin による消化には前述の Sørensen の pH 1.8 の枸橼酸-塩酸緩衝液を用い、NaOH 溶液で中和してから使用した。なおまた、Relaxin 製品は前述の P-123-1である。

筋の疲労などと Relaxin の作用の関係を確める目的で筋肉及び腸管の浸出液をつくつた。即ちラッテの股筋及び臀筋の略々2g、または内腔を清水で充分洗滌した小腸(回腸)の略々2gを何れも細切し10ccの栄養液に浸して0°Cまたは37°Cで夫々4時間保つたものである。此の浸出液をそのまま、または加熱し、凝固した場合は均質化して各1ccをMagnus装置の容器中に注加して、その影響を観察した。

II 実験成績及び考察

〔I〕 Relaxin の実験的不活性化

Relaxin 製品に対する各種の処理がその力価に及ぼす影響は一括して次表に掲げた。

(i) Relaxin に対する加熱の影響

対照試験として4 GPU/cc の Relaxin 溶液0.5cc宛の注射により、3回とも殆ど全動物の恥骨は弛緩して明らかな反応を呈した。此の中の1例に於て供試モルモット8頭中の1頭のみが反応しなかつたが、これは実験誤差として、本実験のような生物検定では許容されるべき範囲内のものと思われる。従つて使用 Relaxin 2 GPU の注射により、供試動物の殆ど100%のものが反応することを確認した。

この Relaxin 溶液を加熱した場合、63°C、30分では、その力価は殆ど失われなかつたが、63°C、1時間または65°C、1時間では恥骨に対する反応は完全に失われ、その力価を検知することは出来なかつた。以上のことから、63°C、30分では非常に不完全ではあるが、63°C、1時間の加熱により Relaxin は、その力価を喪失し、少くとも恥骨反応は完全に失われることを知つた。

次に少量の栄養液に溶かした5 GPU の Relaxin は63°C、1時間の加熱によりても、なお *in vitro* に於てラッテの子宮の攣縮を抑制し、之を完全に弛緩せしめた〔Fig. 1〕。

然るに100°C、1時間の加熱を受けた5 GPU の Relaxin は子宮運動に対する *in vitro* の抑制効果を完全に失つていた〔Fig. 2〕。

従つて、恥骨に対する Relaxin の効果は63°C、1時間の加熱で失われる。然しながら Relaxin のもつ生理学的活性は63°C、1時間の加熱でもなお保たれており、明らかな *in vitro* 子宮運動

Table 1. Experimental inactivation of relaxin by heating, aeration, and digestion with proteolytic enzymes.

Treatment		No. of guinea pigs used	No. of animals showing positive response	Relaxin activity of dose, GPU	
				Before treatment	After treatment
Relaxin 1mg./5cc.+None	a)	9	9	2	2.0
" "	"	8	8	2	2.0
" "	"	8	7	2	1.8
Relaxin 1mg./5cc.+Heating 65°C., 1hr.	a)	6	0	2	0
" " 63°C., "	"	10	0	2	0
" " " "	"	6	0	2	0
" " " 30min.	"	10	8	2	1.4
Relaxin 1mg./5cc.+Incubation 37°C., 2hrs.	b)	10	9	2	1.9
" " " " "	"	6	6	2	2.0
Relaxin 1mg./5cc.+Trypsin 20,000H.U.M., 37°C., 2hrs.	b)	10	0	2	0
" " " " " "	"	8	0	2	0
" " " 10,000H.U.M. " "	"	10	0	2	0
Relaxin 1.5mg./7.5cc.+Pepsin 6mg., 37°C., 2hrs.	c)	9	0	2	0
" " " 2mg., " "	"	8	2	2	0.4
Relaxin 3mg./15cc.+Aeration 60cc/min. 1hr.	a)	10	10	2	2.0
" " " " 4hrs.	"	8	8	2	2.0

a : dissolved in physiological saline.

b : dissolved in Sørensen's phosphate buffer solution of pH 7.1.

c : dissolved in Sørensen's citrate buffer solution of pH 1.8; and after digestion with pepsin, the mixture was neutralized and then injected to guinea pigs.

(1) For trypsin, "Trypsilin" which is a lyophilized crystalline trypsin of the Mochida Pharmaceutical Mfg. Co., Ltd. was used and the potency of which is shown by H. U. M. (Haemoglobin Unit of Mochida).

(2) Pepsin used was the Grubler's pepsin preparation.

(3) Relaxin used was preparation P-123-1 assaying 20—40 GPU/mg. which was kindly supplied by Dr. E. H. Frieden; according to our assay its potency was approximately 20 GPU/mg. and this value was used for estimation of relaxin activity in this experiment.

抑制作用を示すが、100°C, 1時間の加熱によりて、それらは完全に失われる。Felton, L. C., Frieden, E. H. and Bryant, H. H. (1953) は Relaxin も URF (Uterine Relaxing Factor) も共に子宮弛緩を生ぜしめるが Relaxin は URF の中の一つであることを示唆している。

また此の二つの物質の化学的性質はよく似ていると云われているが、普通の Relaxin 製品中には Relaxin と URF が含まれているとすれば、その混在は子宮に対する効果と恥骨縫合に対する効果に於て耐熱性の不一致の可能性を与える。然しながら筆者等の実験結果は必ずしも Relaxin 製品中また Relaxin そのものに夫々の作用をもつた二つの活性物質の存在を示すものとは限らず、残存活性物質の濃度の差に基くものかも知れないがその可能性は少ないように思われる。

(ii) 蛋白分解酵素による Relaxin の破壊

25GPU 含有の Relaxin 溶液に対し 10,000 H. U. M. または 20,000 H. U. M. の Trypsin を

接触させた。従つて1GPU 当り 400 H. U. M. または 800 H. U. M. の酵素が作用したことになる。斯く Trypsin で消化した Relaxin 溶液については恥骨法により Relaxin を検出できなかった。一方使用緩衝液に同じ濃度 (2 GPU/0.5cc) の Relaxin に対し 37°C, 2時間の加温を行つたが Relaxin の力価の低減はみられなかつた。従つて 37°C, 2時間の加温では Relaxin の力価は低減せず、上述の Trypsin 処理による Relaxin の力価の喪失は、Trypsin により Relaxin が消化破壊されたことに起因するものと考えられる。

また既述の濃度の Relaxin 溶液に対し 25GPU 当り 2mg 及び 6mg の Pepsin を加え 37°C, 2時間で消化を行つた。その結果、Pepsin 6mg の場合は溶液の Relaxin の消化は完全に恥骨反応は認められなかつたが、2mg の場合は供試動物 8 頭中の 2 頭が明らかな恥骨反応を呈し消化は不完全であることを示した。酸性溶液では Relaxin は比較的安定なことが知られている。Pepsin での消化試験は pH 1.8 の枸橼酸-塩酸緩衝液を用いた訳であるが、酸性溶液の関係もあつてか 2mg の Pepsin の場合、Relaxin の効果の一部は保たれていた。従つて、勿論のことであるが適量またはそれ以上の量の Pepsin によりて Relaxin は消化破壊せられることを認めた。

以上の如く Trypsin や Pepsin により Relaxin は消化されるが、これらの酵素により、おそらく Relaxin の Peptide の結合が切断されて、その力価を失うものと思推せられる。

(iii) Relaxin に対する酸素ガス通気の影響

既述の方法により Relaxin 溶液に酸素ガスを通したが、1時間及び4時間の通気もその力価を低減させることが出来なかつた。筆者等の別の実験からして Hyaluronidase の如き酵素に対しては、著しく力価の低減を生ずる程度の通気であるにもかかわらず、Relaxin では力価の低減はみられなかつた。酸素ガスの酸化作用は、あまり強力なものとは云われないのであるが、兎に角、Relaxin は酸素そのものに対しては相当に安定な物質であることが判つた。

以上、要するに63°C, 1時間の加熱及び Trypsin や Pepsin での消化により、モルモットの骨盤に対する Relaxin の効果はみられなくなる。Relaxin の抽出方法からしても Estrogen の混在は考えられず、事実 Abramowitz et al. (1944) は彼等の抽出物の少くとも 120GPU の Relaxin はラットの膣垢反応に於て角化細胞を出現せしめなかつたことからして Estrogen が含まれていないことを証明している。また、Estrogen は脱落膜反応に於ける progesterone の作用を抑制するが去勢ラットの子宮の水分含量を増加する。ところが脱落膜反応を抑制するに充分な Relaxin は子宮の水分含量を増加しなかつた。此の点から Frieden, E. H. and Velardo, J. T. (1952) は彼等の Relaxin 製品中に Estrogen が含まれていないことを証明している。筆者等は膣垢法や子宮水分定量法などの試験を行つてはいないが、前述の実験成績は Relaxin は明らかに蛋白質系の物質で、Polypeptide であると言う Frieden and Hisaw その他の報告を肯定するものであり、またその効果に対する Steroid 系物質の混在を否定するものである。

〔II〕 Relaxin の子宮攣縮抑制効果に対する Oxytocic な物質の阻害

(i) Oxytocin による Relaxin の効果の阻害

Oxytocin の子宮収縮作用はすでによく知られた事実である。本実験に於ても少量の Oxytocin で子宮は直ちに収縮した。閾値は求めなかつたが、40cc の栄養液に対し、モルモットの或る子宮標品は 0.04 I. U. の Oxytocin の添加即ち 0.001 I. U. /cc の濃度で不完全な強縮を示した。また、ラットの或る標品では 0.003 I. U. の Oxytocin の添加で収縮後の弛緩は略々 1/2 に減退し不完全になつたが、之に対しさらに 0.003 I. U. の添加により完全に強縮し、弛緩は殆どみられず、Plateau に僅に鈍い鋸歯状の攣縮の痕跡をとどめる程度の運動を示した [Fig. 3]。

Oxytocin の有効時間は、その用量と略々比例し、少量の場合は単に2, 3個の攣縮が強縮するのみであるが量が増すにつれて有効時間が長くなる。大量の Oxytocin では攣縮は完全に強縮して平滑な Plateu を示し運動は全く停止するが、これとても時間の経過につれて個々の攣縮に分離し、その弛緩の谷は次第に深くなり攣縮の基線は円滑な傾斜を示し、もとの運動に復帰する。

Relaxin の抑制効果の現われないような子宮に対しては勿論のこと、Relaxin の効果が略々完全に現われ、子宮は弛緩して全く運動を停止し僅かな電気刺激では十分に攣縮を起し得なかつたような場合でも、少量の Oxytocin により直ちに強縮した。例えば 0.045GPU/cc の Relaxin 濃度で完全に弛緩したモルモットの子宮で感応電流の弱刺激に応じなかつたものが 0.2 I. U. 従つて 0.005 I. U. /cc の Oxytocin 濃度で顕著な収縮を示した。また、僅かの電気刺激に充分に応じなかつた子宮標品が 0.00125 I. U. の Oxytocin 濃度で直ちに収縮した。然しながら予め Relaxin で弛緩せしめたような子宮は、勿論 Oxytocin で直ちに収縮するが、やや多量の Oxytocin 添加でも比較的短時間で正常運動に復帰する。かかる場合、精密に検討すれば単位時間内の攣縮は少々増加し、恰かも収縮と弛緩が共に刺激促進せられたような状態が屢々観察された。なお、疲乏した標品に対しては Oxytocin の効果はみられなかつた。以上の諸観察の結果から子宮に対する Oxytocin と Relaxin の関係は、量的関係に基くことは明かであるが Relaxin により弛緩した子宮も Oxytocin により比較的容易に収縮することが判つた。然して、此の事は分娩の到来の時期が決る一つの要素になるものであらうと推察される。

(ii) Trypsin 製品の Oxytocic な作用による Relaxin の効果の阻害

蛋白分解酵素による 37°C, 2時間の消化により、また 63°C, 1時間の加熱により恥骨弛緩に対する Relaxin の効果がみられなくなることは既に述べた。此の場合、恥骨反応以外の効果も失われ Relaxin が完全に破壊されるや否やを確かめる目的もあつて此の実験を行つた。そのために、先づ Trypsin 及び Pepsin そのものの子宮運動に対する影響を検討した。

40cc の栄養液に対し 100°C, 30分の加熱を受けた 5,000 H. U. M. の Trypsin の添加は僅かではあるが子宮の収縮を惹起した。また 63°C, 1時間の加熱を受けた 2,500 H. U. M. の Trypsin も子宮の軽微な収縮を起した。然るに 100°C, 1時間の加熱を受けた 2,500 H. U. M. の Trypsin は子宮運動に対し何の影響も与えなかつた [Fig. 4]。之に反し、無処理の 2,500 H. U. M. の Trypsin は顕著な子宮の収縮を起し、Oxytocin の如き影響を与えた [Fig. 2]。Trypsin で強縮した子宮に対し 15GPU の Relaxin を添加したが再び子宮を弛緩せしめることは出来なかつた。

以上のことから、Trypsin 製品は *in vitro* で子宮を強縮せしめるが、此の作用は 100°C, 1時間の加熱により完全に失われる。従つて此の oxytocic な効果は Trypsin 製品中に含まれているかも知れない無機物質によるものではなく、活性酵素の作用または混在する可能性のある比較的易熱性物質に基くものと思推せられる。Clark, A. J. (1924) により Proteose の或る分解産物はモルモットに於て子宮筋の収縮を惹起することが知られた。Clark の proteose 分解物中に Tryptin などの如き物質の混入の可能性もありうるように思われるし、また筆者等の Trypsin 製品に於ても proteose 分解物の混在を完全に否定することは出来ないように思われる。何れにしても Trypsin 製品には oxytocic な作用があると思われる。従つて Trypsin で 37°C, 2時間の消化を受けた Relaxin 溶液は恥骨反応を起こさないが、*in vitro* で oxytocic な効果を示す結果になる [Fig. 5]。

Pepsin 6mg を 0.5cc の溜水に溶解して何等の処理も加えないもの、また同じく 6mg の Pepsin の溶液を 63°C, 1時間加熱したものを栄養液に添加した場合、子宮運動に対しては夫々何の影響も与えなかつた [Fig. 1]。また、Pepsin 6mg と Relaxin 5 GPU を pH 1.8 の枸橼酸一塩酸緩

衝液に溶解し5時間接触させたものも子宮には何の効果も与えず強縮も弛緩もみられなかつた〔Fig. 4〕. 従つて Pepsin は Relaxin を消化してその効果を失わせるが, Pepsin そのものはラッテの子宮に対し何の影響も与えない. 但し Pepsin の酵素的作用の至適 pH は1.8~2.3くらいで, その作用には少くとも pH 5 くらいより以下であることが望ましいと云われている. 本実験は此の条件を充分満足させていないが, 血液や体液には緩衝作用もあり, 実際的にもそれらの pH が極端に酸性を示すことは考えられない. *in vitro* に於ける物質の作用が, 直ちに必ずしも *in vivo* の効果を示すものではないが Pepsin そのものは子宮運動と無関係であると思われる.

(iii) 筋肉竝に小腸浸出液の oxytocic な作用による Relaxin の効果の阻害

筆者等は運動中の子宮標品に於て疲労素または Relaxin 阻害物質の生成により子宮の *in vitro* 運動に対する Relaxin の作用が抑制されることを前報⁷⁾ に於て推定した. 37°C, 4時間の筋浸出液 1cc を 40cc の栄養液に添加した場合, Relaxin で弛緩した子宮は収縮する〔Fig. 1, Fig. 2〕. 但し Relaxin が強く作用していると思われる標品では顕著な子宮の収縮はみられなかつた. 此の浸出液を100°C, 30分及び 63°C, 30分加熱したが, 極く僅かながら oxytocic な効果があり, 然かも 63°C の場合は 100°C の場合よりもその効果が大きいように思われた〔Fig. 2〕. 従つて此の Relaxin 抑制因子は上述の程度 of 加熱では完全に破壊されないことが判つた. なお, 0°C, 4時間の筋浸出液も僅かながら oxytocic な効果をもっていることは注目されねばならない.

さらに 37°C, 4時間の筋浸出液が評価すべき効果を示さなかつた標品に於て腸浸出液 1cc の添加は oxytocic な効果を示し, その追加注入は, より大きな oxytocic な効果を示した〔Fig. 4〕. これらのことから腸浸出液は筋浸出液よりも, より高い oxytocic 作用を呈し, より強力な Relaxin 抑制因子を含んでいるものと思われる. これは腭液中に分泌せられた Trypsinogen が小腸の Enterokinase により賦活されて Trypsin になること及び筆者等の上述の実験から考えて Trypsin またはその関連物質の作用に因るものと考えられる. また消化管粘膜の Enterochromaffine Cells などに 5-Hydroxytryptamine が見出され, 別名 *eramine* と呼ばれ滑平筋収縮作用のあることが知られている (Erasmeyer, V., 1940~42) が腸浸出液中には斯かる物質が遊離していることも考えられる.

さらに Bell, G. H. and Robson, J. M. (1935) は妊牛, 妊婦の血清から oxytocic な物質を検出しており, これら oxytocic な物質は妊娠の特定の時期と関係がなく, また Cholin 誘導体, Histamine, oxytocin の何れでもないことを確めている. また同時に, 此の oxytocic な抽出物中には抗 oxytocic な物質が含まれており静置中に増加することを報告している. 此の抗 oxytocic な物質と Relaxin との関係は判らない. 一方筆者等の筋浸出液中には ATP や Actomyocin, その他の各種の物質の溶出していることが考えられる. 此のように子宮筋の収縮に関係した物質, または oxytocic な物質は相当に多種類あり, これらは子宮に対する Relaxin の作用を阻害するものと思われる.

此の研究を行うに当り, 本学医学部山崎英正教授より種々御助言を戴いた. 茲に記して深謝の意を表する.

III 摘 要

此の実験に於て Relaxin の主なる二つの生理学的効果—骨盤弛緩と *in vitro* 子宮運動の抑制—に対する加熱, 蛋白分解酵素による消化, 及び酸素ガス通気の影響を検討した. また, Oxytocin の他に, Trypsin 製品, 筋肉浸出液及び腸浸出液などが, その oxytocic な効果により Relaxin の効果を阻害することを知つた.

1) Relaxin 製品の有する恥骨弛緩効果は Trypsin 及び Pepsin による37°C, 2時間の消化により失われた。

2) Relaxin 製品の恥骨弛緩効果は 63°C, 30分の加熱によりては殆ど低減しなかつたが, 63°C, 1時間の加熱によりて失くなつた。子宮の *in vitro* 自発運動に対する Relaxin 製品の抑制効果は 63°C, 1時間の加熱では保たれていたが, 100°C, 1時間の加熱により全く観察されなかつた。従つて Relaxin 製品の上述の二つの生理学的効果を破壊する温度は異つてゐると思われた。

3) 酸素ガスの通気 (60cc/min, 4時間) は Relaxin の効果に何の影響も与えなかつた。

4) これらの結果から Relaxin は比較的易熱性の物質であり, また蛋白分解酵素による消化からして, これまでの研究者が報告している如く Relaxin は polypeptide の一つであるように思われる。

5) 使用した Tryptin 製品は Oxytocin の如く子宮に対し顕著なる oxytotic な効果を示した。100°C, 30分及び 63°C, 1時間加熱した Trypsin は僅かながら oxytotic な効果を示したが, 此の oxytotic な効果は 100°C, 1時間の加熱によりて完全に失われた。

6) Pepsin の酵素的活性に対して適当とは云えないが, 中性溶液に於て Pepsin 製品は子宮運動に対して何の影響も与えなかつた。

7) ラットの筋肉及びよく洗滌した腸 (回腸) を 0°Cまたは37°Cで Locke 氏液に4時間浸した。これらの筋肉及び腸の浸出液は夫々 oxytotic な効果を示し, 前者の効果よりも後者のそれが, いくらか強いように思われた。従つて, 子宮の運動に関して, 種々の Relaxin inhibitor があるように思われる。

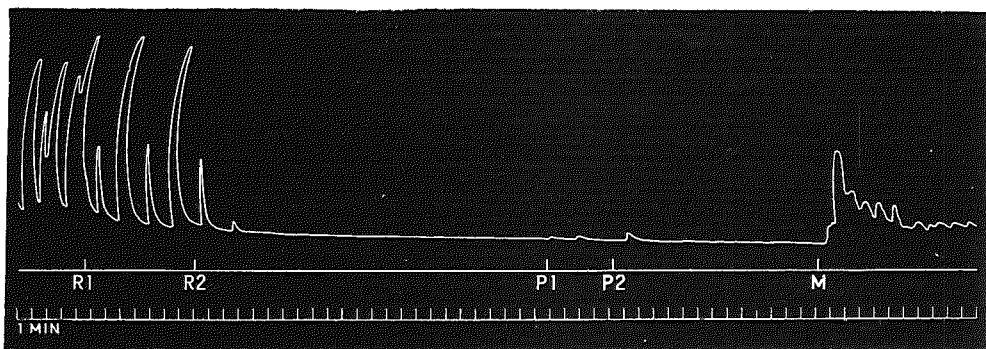
8) Oxytocin そのものは本来の作用により Relaxin の効果を阻害したが, 疲憊状態に陥つた子宮は Oxytocin 及び Relaxin の何れにも反応しなかつた。

文 献

- 1) Abramowitz, A. A., Money, W. L., Zarrow, M. X., Talmage, R. V., Kleinholz, L. H. and Hisaw, F. L. (1944): Preparation, biological assay and properties of relaxin. *Endocrinol.*, **34**, 103—114.
- 2) Bell, G. H. and Robson, J. M. (1935): Oxytotic properties of blood extracts and their physiological significance. *J. Physiology*, **84**, 351—361.
- 3) Frieden, E. H. (1951): The effects of cystine and other reducing agents upon relaxin. *Archives of Biochemistry*, **30**, 138—143.
- 4) Felton, L. C., Frieden, E. H. and Bryant, H. H. (1953): The effects of ovarian extracts upon the guinea pig uterus *in situ*. *J. Pharmacology and Expt. Therapeutics*, **107** (2), 160—197.
- 5) Frieden, E. H. and Hisaw, F. L. (1951): The biochemistry of relaxin. Recent progress in hormone research. *Proceedings of the Laurentian Hormone Conference*, **8**, 333—378.
- 6) Sawyer, W. H., Frieden, E. H. and Martin, A. C. (1953): *In vitro* inhibition of spontaneous contractions of the rat uterus by relaxin-containing extracts of sow ovaries. *Amer. J. Physiology*, **172** (3), 547—552.
- 7) Unger, G. (1947): Release of proteolytic enzyme in anaphylactic and pepton shock *in vitro*. *Lancet*, **1**, 708—709.
- 8) Wada, H. and Yuhara, M. (1956): Inhibitory effect of relaxin preparation upon spontaneous uterine contractions of the rat and the guinea pig *in vitro*. (in Japanese) *Sci. Rept. Facul. Agr. Okayama Univ.*, No. 9, 11—20.
- 9) 山崎英正 (1954): 細胞からのヒスタミン遊離; *生体の科学*, **6** (1), 2—12.

Fig. 1. Effects of relaxin preparation heated and of pepsin preparation upon the motility of the rat uterus *in vitro*.

40 cc. chamber, 37°C.



R1: 5 GPU of relaxin heated for 30 min. at 100°C.

R2: 5 GPU of relaxin heated for 1 hr. at 63°C.

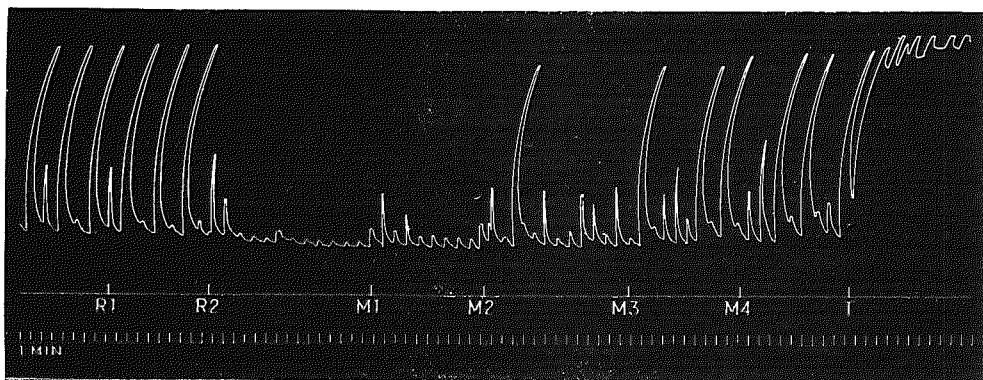
P1: 6 mg. of pepsin heated for 1 hr. at 63°C.

P2: 6 mg. of pepsin unheated

M : 1 cc. of muscle extract (4 hrs., 37°C.)

Fig. 2. Showing perfect inactivation of relaxin preparation by heating at 100°C. for 1 hr., and oxytotic effects of trypsin preparation and of muscle extract in the rat uterus *in vitro*.

40 cc. chamber, 37°C.



R1: 5 GPU of relaxin heated for 1 hr. at 100°C.

R2: 5 GPU of relaxin unheated

M1: 1 cc. of muscle extract (4 hrs., 37°C.) heated for 30 min. at 100°C.

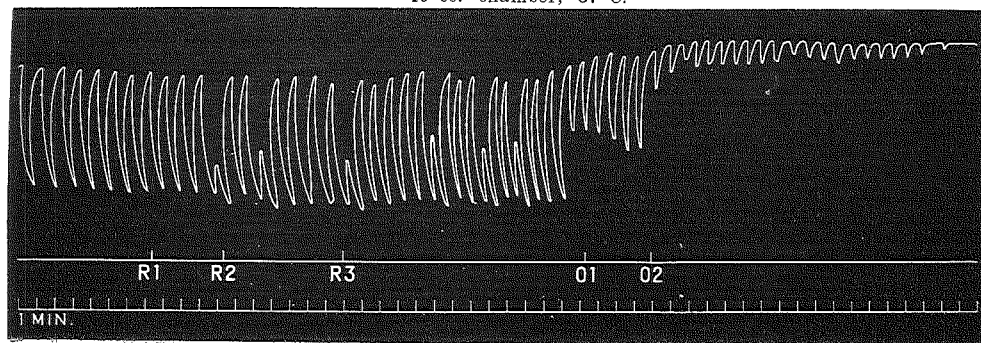
M2: 1 cc. of muscle extract (4 hrs., 37°C.) heated for 30 min. at 63°C.

M3: 1 cc. of muscle extract (4 hrs., 0°C.)

M4: 1 cc. of muscle extract (4 hrs., 37°C.)

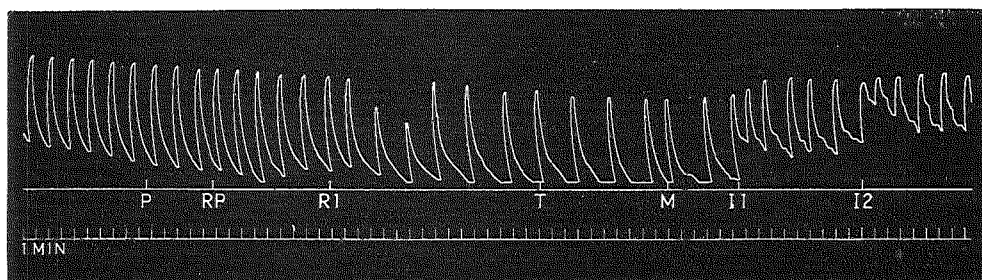
T : 2500 H. U. M. of trypsin preparation

Fig. 3. Effect of oxytocin upon *in vitro* spontaneous motility of the rat uterus which showed scarcely any response to relaxin.
40 cc. chamber, 37°C.



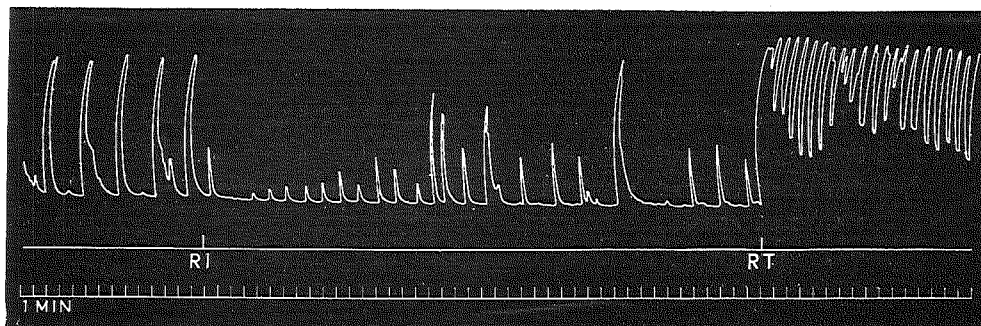
R1: 10 GPU of relaxin	O1: 0.003 I. U. of oxytocin
R2: 10 GPU of relaxin	O2: 0.003 I. U. of oxytocin
R3: 10 GPU of relaxin	

Fig. 4. Showing inactivation of relaxin by digestion with pepsin preparation, destruction of oxytocic activity of trypsin preparation by heating at 100°C., 1 hr. and oxytocic effect of the ileum extract upon the rat uterus *in vitro*.
40 cc. chamber, 37°C.



P : 6 mg. of pepsin	M : 1 cc. of muscle extract (4 hrs., 37°C.)
RP: 5 GPU of relaxin+6 mg. of pepsin, 4hrs., 37°C.	I1: 1 cc. of ileum extract (4 hrs., 37°C.)
R1: 5 GPU of relaxin unheated	I2: 1 cc. of ileum extract (4 hrs., 37°C.)
T : 2500 H. U. M. of trypsin, 1 hr., 100°C.	

Fig. 5. *In vitro* contractions of the rat uterus caused by oxytocic activity of trypsin preparation which was used for digestion of relaxin.
40 cc. chamber, 37°C.



R1: 4 GPU of relaxin	RT: 10 GPU of relaxin+20,000 H. U. M. of trypsin, 37°C., 2 hrs.
----------------------	---